

METHOD FOR PRETREATING WHOLE BLOOD FOR MEASURING SACCHARIFIED HEMOGLOBIN

Patent number: JP2000180439
Publication date: 2000-06-30
Inventor: ATSUDA YASUSHI; KOMIYAMA KISHISATO; GOTO MOTOO
Applicant: WAKO PURE CHEM IND LTD
Classification:
- international: **C12Q1/26; C12Q1/37; G01N33/48; G01N33/72; C12Q1/26; C12Q1/37; G01N33/48; G01N33/72; (IPC1-7): G01N33/48; C12Q1/26; C12Q1/37; G01N33/72**
- european:
Application number: JP19980362559 19981221
Priority number(s): JP19980362559 19981221

Report a data error here

Abstract of JP2000180439

PROBLEM TO BE SOLVED: To avoid the influence of saccharified albumin that is generated when measuring saccharified hemoglobin in whole blood by utilizing an enzyme reaction by treating the whole blood with a substance forming a complex with albumin and then measuring it. **SOLUTION:** In a method for measuring saccharified hemoglobin in whole blood by the enzyme method, the whole blood is treated by a substance for forming a complex with albumin before measurement. As the substance for forming a complex with albumin, for example an antialbumin antibody and blue coloring matter CibacronBlueF3G-A, or the like can be listed. Also, as the concentration of the substance for forming the complex with albumin, the substance is added so that it can be normally 1/50-100, preferably 1/10-10 times the concentration of albumin. By executing the above method, the saccharified hemoglobin in the whole blood can be measured by the enzyme method without any complex operation for separating the whole blood into globules and plasma.

.....
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-180439

(P2000-180439A)

(43) 公開日 平成12年6月30日 (2000. 6. 30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/48		G 0 1 N 33/48	B 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/26		C 1 2 Q 1/26	4 B 0 6 3
1/37		1/37	
G 0 1 N 33/72		G 0 1 N 33/72	A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平10-362559	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22) 出願日	平成10年12月21日 (1998. 12. 21)	(72) 発明者	篤田 康史 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		(72) 発明者	小見山 妃嗣吏 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		(72) 発明者	後藤 元雄 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法

(57) 【要約】

【課題】 酵素反応を利用して全血中の糖化ヘモグロビンを測定する際に生じる糖化アルブミンの影響を回避し得る、糖化ヘモグロビン測定方法の提供。

【解決手段】 酵素法により血液試料中の糖化ヘモグロビンを測定する方法に於て、全血をアルブミンとコンプレックスを形成する物質で処理し、次いで当該測定に付することを特徴とする、全血中の糖化ヘモグロビンの測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 酵素法により血液試料中の糖化ヘモグロビンを測定する方法に於て、全血をアルブミンとコンプレックスを形成する物質で処理し、次いで当該測定に付することを特徴とする、全血中の糖化ヘモグロビンの測定方法。

【請求項 2】 アルブミンとコンプレックスを形成する物質が抗アルブミン抗体である請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】 全血を、アルブミンとコンプレックスを形成する物質で処理することを特徴とする、糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法。

【請求項 4】 アルブミンとコンプレックスを形成する物質が抗アルブミン抗体である請求項 3 に記載の前処理方法。

【請求項 5】 アルブミンとコンプレックスを形成する物質を含有してなる、糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理試薬。

【請求項 6】 アルブミンとコンプレックスを形成する物質が抗アルブミン抗体である請求項 5 に記載の前処理試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酵素法による、全血中の糖化ヘモグロビンの測定方法、並びに糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法及び該全血の前処理試薬に関する。

【0002】

【従来技術】 糖化ヘモグロビン (HbA_{1c}) とは、拡散により赤血球に入り込んで、血液中の糖 (単糖類) の還元末端と、ヘモグロビンの α 鎖および β 鎖の遊離のアミノ基が非酵素的に Schiff 塩基により結合して形成された不安定なアルドイミン (不安定型) が、さらにアマドリ転移により安定なケトアミン (安定型) へと移行することにより生成されるアマドリ化合物の一種である。糖化ヘモグロビンの濃度は過去 1~2 ヶ月間の血液中の平均的な糖濃度を反映すると言われていたことから、糖尿病の診断マーカーとして広く利用されている。

【0003】 従来の糖化ヘモグロビンの測定法としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法 [Chromatogr. Sci. 10:659(1979)]、アフィニティーカラム法 [Clin. Chem. 28:2088(1982)]、電気泳動法 [Clin. Chem. 26:1598(1980)]、チオバルビツール酸法 [Clin. Chim. Acta 112:179-204(1981)]、免疫学的測定法 [JJCLA 18:620(1983)、機器・試薬 16:33-37(1993)] 等がある。

【0004】 しかしながら、これらの方法は何れも何らかの問題点を有している。まず、HPLC 法は、最も普及しており、測定精度や再現性が良いが、高価で特別な機器を必要としたり、単位時間当たりの処理検体数が少ないという点で問題がある。

【0005】 アフィニティーカラム法、電気泳動法、チオバルビツール酸法は何れの方法も操作性、処理能力の点で問題がある。

【0006】 免疫学的測定法は、近年開発された方法で自動分析装置での測定が可能のため、操作が簡便で処理検体数も多く、HPLC 法との相関のよい方法ではあるが、HPLC 法に比べ再現性の点で問題がある。

【0007】 近年、上記した如き問題を解決するために、糖化ヘモグロビン等のアマドリ化合物を基質として過酸化水素を生成する酸化還元酵素を利用した糖化ヘモグロビン測定法が提案されている (特開平 2-195899 号公報、特開平 2-195900 号公報、特開平 3-155780 号公報、特開平 4-4874 号公報、特開平 5-192193 号公報、特開平 6-46846 号公報、特開平 7-289253 号公報、特開平 8-154672 号公報、特開平 8-336386 号公報、特開平 10-201473 号公報)。

【0008】 しかしながら、血液中には、アマドリ化合物として糖化ヘモグロビン以外に糖化アルブミンも含まれており、アマドリ化合物を基質とする酸化還元酵素を使用し、全血を試料として糖化ヘモグロビンの測定を行った場合、糖化アルブミンによる正誤差が生じる。このような正誤差を回避するためには、全血から血漿成分を取り除くための操作、例えば遠心分離処理等の煩雑な操作が必要であった。

【0009】 そのため、上記した如き問題を解決した、酵素法による糖化ヘモグロビンの測定を行うための、効率的な全血の前処理方法が強く望まれているが、未だ実現されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 上記した如き状況に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、酵素反応を利用して全血中の糖化ヘモグロビンを測定する際に生じる糖化アルブミンの影響を回避し得る、糖化ヘモグロビン測定方法、並びに糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法および前処理用試薬を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記課題を解決する目的でなされたものであり、酵素法により全血中の糖化ヘモグロビンを測定する方法に於て、全血をアルブミンとコンプレックスを形成する物質で処理し、次いで当該測定に付することを特徴とする、血液試料中の糖化ヘモグロビンの測定方法の発明である。

【0012】 また、全血をアルブミンとコンプレックスを形成する物質で処理することを特徴とする、糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法の発明である。

【0013】 更に、アルブミンとコンプレックスを形成する物質を含有してなる糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理試薬の発明である。

【0014】 本発明者らは、全血を試料とした酵素法による糖化ヘモグロビンの測定であって全血中の糖化アル

ブミンによる測定値への悪影響を回避し得る高精度な糖化ヘモグロビンの測定法を開発すべく鋭意検討を行った結果、全血を、アルブミンとコンプレックスを作る物質で前処理した後に測定に供すれば、糖化アルブミンの影響を受けることなく、全血中の糖化ヘモグロビンを高精度に測定し得ることを見だし、本発明を完成させるに至った。

【0015】本発明に係るアルブミンとコンプレックスを形成する物質としては、例えば抗アルブミン抗体やブルー色素Cibacron BlueF3G-Aなどが挙げられ、中でも抗アルブミン抗体が好ましいものとして挙げられる。

【0016】また、ブルー色素Cibacron BlueF3G-Aは、適当な担体に共有結合で固定化したもの（ブルートリアクリル：和光純薬工業（株）商品名、ハイトラップブルー：ファルマシア商品名）でもよい。

【0017】尚、抗アルブミン抗体は、市販品でも常法により適宜調製されたものでもよく、また、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、ポリクローナル抗体がより好ましい。

【0018】本発明に係るアルブミンとコンプレックスを形成する物質の使用濃度としては、全血中の糖化ヘモグロビンを測定する際に生じる糖化アルブミンによる影響を抑止し得る濃度であればよく特に限定されないが、糖化ヘモグロビン測定用全血を処理する際に、本発明に係るアルブミンとコンプレックスを形成する物質の濃度がアルブミン濃度に対し、通常1/50～100倍、好ましくは1/10～10倍となるように添加される。

【0019】例えば、アルブミンとコンプレックスを形成する物質として抗アルブミン抗体を使用する場合には、サンプル中のアルブミンの濃度にもよるが、サンプルと前処理用試薬混合時の抗アルブミン抗体濃度が通常0.08～400mgAb/ml、好ましくは0.4～40 mgAb/mlとなるように添加される。

【0020】本発明の糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法は、本発明に係るアルブミンとコンプレックスを形成する物質を添加することにより行われる。

【0021】尚、本発明の前処理方法を行って得られた試料中の糖化ヘモグロビンの測定は例えば特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報、特開平 5-192193号 *

N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-

ジメトキシ-4-フルオロアニリン(FDAOS) 360mM

4-アミノアンチピリン(4AA) 1350mM

ペルオキシダーゼ(POD) 3.6U/ml

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(FAOD) 9U/ml

【0028】上記(a)で得られたプロテアーゼ処理ヘモグロビン溶液2mlに発色液1mlを加え、37℃で10分間インキュベイトした後、600 nmの吸光度を測定した。次に検体として生理食塩水及び市販の糖化ヘモグロビン標準を用いて同様の操作を行い、これを用いて検量線を作成し、検体1, 2及び3中に含まれる糖化ヘモグロビン量

* 公報、特開平6-46846号公報、特開平7-289253号公報、特開平8-154672号公報、特開平8-336386号公報などに記載の自体公知の酵素法に準じて行えばよい。

【0022】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0023】

【実施例】実施例1 糖化ヘモグロビンの測定

(1) 糖化ヘモグロビン量の測定

(a) 検体及び試薬

検体：EDTA採血全血1, 2及び3

試薬：i) 54mg Ab/ml抗アルブミン抗体溶液

ii) ペプシン液：0.6mg/ml ペプシン in 0.01N HCl

iii) カルボキシペプチダーゼ(CPase)液：3mg/ml CPaseA及び3mg/ml CPaseY含有50mM 2-モルホリノエタンスルホン酸(MES)緩衝液(pH6.0)

【0024】(b) 糖化ヘモグロビン測定用試料の調製
検体1mlに、水2.5mlを添加し溶血させ、その後に54mg/ml Ab/ml抗アルブミン抗体2.5mlを添加混合し全量を6mlとし、これを糖化ヘモグロビン測定用試料とした。

【0025】(c) プロテアーゼ処理

上記(b)で得られた糖化ヘモグロビン測定試料6mlにペプシン液を1ml添加し塩酸でpH2に調整し、全量を8mlとした。この調製液を35℃で30分間インキュベイトすることによりペプシン処理を行った。インキュベイト終了後、反応液に更に50mM MES緩衝液(pH6.0) 1mlとCPase液1mlを加え、水酸化ナトリウムでpH6.0に調整し、全量を12mlとし、更に35℃で3日間インキュベイトすることによりCPase処理を行った。反応終了後、反応液に200mM 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液(pH7.5)を1.5ml加え、水酸化ナトリウムでpH7.5に調整し、全量を15mlとし、これをプロテアーゼ処理ヘモグロビン溶液とした。

【0026】(d) 糖化ヘモグロビン量の測定

上記(c)で得られたプロテアーゼ処理ヘモグロビン溶液中の糖化ヘモグロビン量は日立557形分光光度計(日立製作所(株)製)を用い、下記の如くして行った。

【0027】発色液：以下の試薬を含有する200mM HEPES緩衝液(pH7.5)を発色液とした。

(g/dl)を求めた。

【0029】(2) ヘモグロビン量の測定

検体：上記(1)で用いたものと同じ。

和光純薬工業(株)製のヘモグロビンB-テストワコー(SLS-ヘモグロビン法)を使用して上記検体中のヘモグロビン量(g/dl)を求めた。

【0030】(3) ヘモグロビン中の糖化ヘモグロビン含有率(%)の算定

* 下記計算式から糖化ヘモグロビン含有率を算定した。結果を表1に示す。
糖化ヘモグロビン量(g/dl)

$$\text{糖化ヘモグロビン含有率(\%)} = \frac{\text{糖化ヘモグロビン量(g/dl)}}{\text{ヘモグロビン量(g/dl)}}$$

【0031】比較例1

実施例1と同じ検体を用い、実施例1(1)(b)に於て、抗アルブミン抗体2.5mlの代わりに水2.5mlを添加した以外は実施例1と同様にして測定を行い、検体中の糖化ヘモグロビン含有率(%)を求めた。結果を表1に併せて示す。

※【0032】参考例1

実施例と同じ検体について、東ソー(株)の自動グリコヘモグロビン分析計(HPLC法)を用いて糖化ヘモグロビン含有率(%)を求めた。結果を表1に併せて示す。

【0033】表 1

※

	実施例1 (抗体添加)	比較例1 (抗体無添加)	参考例1 (HPLC法)
サンプル1	6.6%	8.5%	6.3%
サンプル2	6.2%	9.0%	5.9%
サンプル3	8.6%	11.4%	7.9%

【0034】表1の結果から明らかな如く、本発明の前処理方法で検体を処理することにより、サンプル中の糖化ヘモグロビン含有率(%)の値がHPLC法で求めた糖化ヘモグロビン含有率(%)の値と極めて近い値となることが判る。

【0035】一方、検体を本発明の前処理方法で処理せずに測定を行った場合の糖化ヘモグロビン含有率(%)の値は、前処理を行った場合やHPLC法で測定した場合に比べて有意に高値となることが判る。言い換えれば、本発明の前処理方法で検体を処理しなかった場合には、糖化アルブミンの影響で正誤差が生じることが判る。

【0036】実施例2

検体として、EDTA採血全血検体4~22を用いて、実施例1と同様にして測定を行い、糖化ヘモグロビン含有率(%)を求めた。結果を表2に示す。

【0037】参考例2

実施例2と同じ検体について、ベーリンガー・マンハイム(株)製のリキテックHbA_{1c}II(免疫阻害比濁法)を使用して、ヘモグロビンA_{1c}含有率(%)を求めた。結果を表2に併せて示す。また実施例2の糖化ヘモグロビン含有率(%)と参考例2のヘモグロビンA_{1c}含有率(%)とから得られる相関図を図1に示す。

表 2

	参考例 2 (X)	実施例 2 (Y)
サンプル 4	4.5%	5.1%
サンプル 5	5.1%	6.4%
サンプル 6	5.3%	6.1%
サンプル 7	5.4%	6.4%
サンプル 8	5.9%	6.9%
サンプル 9	4.5%	5.7%
サンプル 10	5.1%	6.3%
サンプル 11	5.3%	6.1%
サンプル 12	4.8%	5.9%
サンプル 13	4.7%	6.3%
サンプル 14	5.2%	6.5%
サンプル 15	5.2%	6.4%
サンプル 16	4.7%	5.5%
サンプル 17	5.0%	6.7%
サンプル 18	6.1%	8.5%
サンプル 19	7.0%	10.5%
サンプル 20	4.7%	6.0%
サンプル 21	4.8%	6.1%
サンプル 22	6.3%	7.8%
AVE	5.2%	6.6%
γ	0.919	

*【0038】表 2 及び図 1 から明らかな如く、本発明の前処理方法で検体を処理することにより、検体中の糖化ヘモグロビン含有率 (%) の値は免疫阻害比濁法で求めたヘモグロビン_{A1c}含有率 (%) の値と良好な相関を示すことが判る。

【0039】尚、本発明の方法で求めた糖化ヘモグロビン含有率 (%) の値は、免疫阻害比濁法で求めたヘモグロビン_{A1c}含有率 (%) の値に比べ若干高値になっているが、これは、糖化アルブミンの影響が回避されていないのではなく、本発明の方法ではヘモグロビン_{A1c}以外の糖化ヘモグロビンも測定しているためである。

【0040】

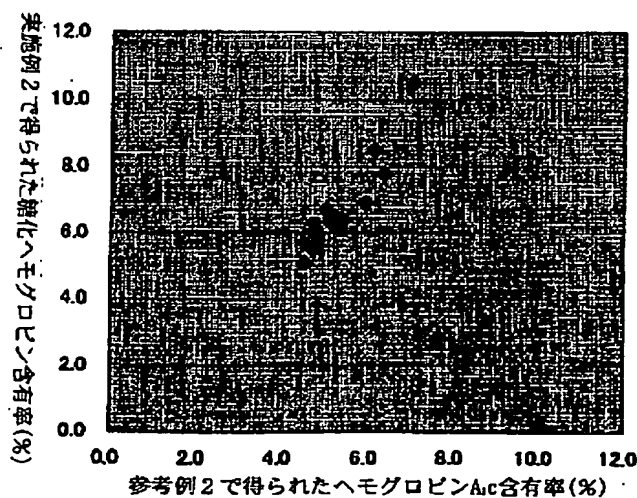
【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、糖化アルブミンの影響を受けることなく、酵素法で全血中の糖化ヘモグロビン量を高精度に測定し得る測定方法及び糖化ヘモグロビン測定用全血の前処理方法並びにこれに用いる前処理試薬を提供するものであり、本発明を実施することにより、全血を血球と血漿に分離するという煩雑な操作を行うことなく全血中の糖化ヘモグロビンを酵素法により測定できるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】参考例 2 で得られたヘモグロビン_{A1c} 含有率 (%) の値と実施例 2 で得られた糖化ヘモグロビン含有率 (%) の値の相関を示す。

*

【図 1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 2G045 AA01 BA01 BA13 BB39 BB50
BB51 CA25 DA38 DA45 DA48
FA29 FB01 FB03 FB06 GC10
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ68 QQ79
QR16 QR48 QR51 QS11 QS20
QX01